Aus der Universitätsfrauenklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Römer

Untersuchung über die Einwirkung verschiedener Zytostatika auf Proteinasen des Ovars

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Schettler
aus Aue

1963

7531

Aus der Universitätsfrauenklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Römer

Untersuchung über die Einwirkung verschiedener Zytostatika auf Proteinasen des Ovars

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Schettler
aus Aue

1963

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Dekan: Professor Dr. Dr. E. Fröhlich

1. Berichterstatter: Dozent Dr. G. Jung

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Römer

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Zytostatika und Zellstoffwechsel	1
Methodisches	5
Herstellung von Homogenaten	5
Schema der Versuchsanordnung	6
Nachweis der Aminosäuren	7
Eichkurve	7
Schema der geprüften Substanzen	8
Berechnung der Fermentaktivität	9
Ergebnisse	10
Bayer E 39	10
Mitomen	11
Honvan	12
Colcemid	13
Thio-Tepa	14
Endoxan	15
Sarvinal	16
Bekannte Kathepsinaktivatoren	17
Variation der Inkubationszeiten	18
Einwirkung von Zytostatika auf Carcinom	19
Vergleich der proteolytischen Aktivität eines mit Endoxan vorbehandelten Carcinoms mit einem unbehandelten	21
Saure und tryptische Proteinasen	22
Diskussion	23
Zusammenfassung	24
Bibliographischer Index	25

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547602_0015

ZYTOSTATIKA UND ZELLSTOFFWECHSEL

Zytostatika besitzen nicht nur eine hemmende Wirkung auf die Zellteilung, sondern sie greifen unmittelbar in den Stoffwechsel der Zelle ein. Es besteht eine Kette von Zusammenhängen zwischen kanzerotoxischen Substanzen und Fermenten.

Experimentelle Untersuchungen zeigten, daß selbst eine einheitliche chemische Verbindung in der Lage ist, mehrere Fermentsysteme zu aktivieren oder zu hemmen. Nach Pütter lassen sich zwei Gruppen von Zytostatika unterscheiden.

Die N-Lost-Derivate, wie z.B. Methyl-bis-(β-chloräthyl-) aminoxyd (Mitomen), hemmen mit allmählich wachsender Konzentration die Atmung, während sie im allgemeinen die aerobe Glykolyse zu aktivieren pflegen. Erst eine hohe Konzentration führt auch hier zu einer Hemmung.

Die Äthylenimine, Chinone und Äthyleniminochinone blockieren in einem gewissen Bereich unter aeroben Bedingungen die Glykolyse. Häufig wird dabei die Atmung in der Weise aktiviert, daß man von einem succinatähnlichen Effekt sprechen kann, z.B. beim 2,5-bis-n-propoxy-3,6-bis-äthylen-imino-benzochinon-(1,4) (Bayer E 39). (27)

Bei Anwesenheit von Glucose steht die Glykolysehemmung an erster Stelle (3).

Äthyleniminverbindungen (bis-Äthyleniminobenzochinon, bis-Äthyleniminohydrochinontriäthylenmelamin) bremsen ohne besondere Wirkung auf die Atmung die Glykolyse des Ehrlich'schen Mäuseaszites-Tumor.

Triphosphat und Fruktosediphosphat reichern sich gegenüber unbehandelten Kontrollen an. Hieraus wurde eine Alkylierung von SH-Gruppen des Fermentes Triphosphat-dehydrogenase durch Reaktion des Äthyleniminringes gefolgert (11).

Ein besonderes Kennzeichen der Wachstumsperioden bildet die aerobe Gärung. Sie führt zur Vermehrung verschiedenster Zellinhaltsstoffe, zur Erhöhung der Pyruvatkonzentration und von hier aus zur Neusynthese von Aminosäuren und Proteinen (12).

Lundsgaard fand, daß diese Reaktionskette durch Jodessigsäure durchbrochen werden kann. Sie hemmt durch irreversible Bindung an SH-Gruppen die Triosephosphatdehydrogenase (13).

Das Zytostatikum E 39 besitzt einen ähnlichen Effekt. Im sauren Milieu (pH 6) wird die aerobe Glykolyse gebremst, und gleichzeitig erscheinen Dihydroxyacetonphosphat und Fructosediphosphat in größerer Menge. Im Gegensatz zur Jodessigsäure kann jedoch das Zytostatikum die Pyruvatkonzentration nicht vermindern. Da auch Milchsäuredehydrogenase während des Versuches seine Konzentration nicht ändert, mußte man ein Absinken an Diphosphorpyridinnukleotid (DPN) postulieren. Durch Nikotinsäureamid wird dieser Abfall wieder aufgehoben. Das bedeutet, daß außer ihres Hemmeffektes auf Triosephosphatdehydrogenase die cancerotoxischen Substanzen eine DPN-ase aktivieren oder als Bremse im Bildungssystem dieses Stoffes dienen (14).

Den Mechanismus, den Holzer für das E 39 nachwies, hatte zuvor bereits Roitt für Triäthyleniminverbindungen (TEM) wahrscheinlich gemacht (28).

Hilz fand eine beträchtliche Aktivierung der Ribonukleasen durch Zytostatika. Auch hierbei scheint eine SH-Blockade einen wesentlichen Faktor darzustellen, denn auch Hg-Ionen sowie Jodessigsäure und Wasserstoffperoxyd zeigen ähnliche Wirkungen.

Stoffe, die sich im Sulfhydrylalkylierungstest als brauchbar erweisen, wie z.B. das Triäthyleniminobenzochinon, sind auch schon in großer Verdünnung im Enzymtest wirksam, während das Äthylenthiophosphorsäureamid (Thio-tepa) nur in geringem Umfang SH-Gruppen bindet. Durch Cystein kann die Ausbildung einer Ribonukleaseaktivierung unterdrückt werden, der Mechanismus selbst ist, einmal im Gang, irreversibel (9).

Wenn nun auch gleichartige Zytostatika auf ganz verschiedenartige Fermente Einfluß nehmen, so differiert beim gleichen Enzym ebenfalls noch die Aktivierungs- und Inhibitorwirkung zwischen Homogenaten einzelner Organe.

Durch Endoxan und andere cancerotoxische Substanzen erzielt man ein Absinken der DPN-Konzentration im Tumorgewebe, aber nicht im Knochenmark, in Milz, Leber und Hoden(2).

In weiteren Untersuchungen an Ratten, die Träger von Jensen-Sarkom waren, wurde von Holzer und Kröger nachgewiesen, daß E 39 speziell die DPN-Konzentration im Tumor, nicht aber in Leber, Hirn und Niere vermindert (16).

Während Äthylenimino benzochinone zum kräftigen Abfall der DPN-Konzentration im Tumor führen, wird dieser nach Endoxananwendung erst nach 3 - 4 Tagen deutlich. Es finden keine charakteristischen Veränderungen der DPN-, DPNH-, TPN- und TPNH-Konzentrationen statt (15).

Resistente Geschwülste weisen gar keine Verminderung der entsprechenden Fermente gegenüber Kontrollversuchen auf, wie Holzer am DS-Sarkom, C-Tumor,

Benzpyren-Tumor und Methylcholanthrentumor prüfte(21).

N-Lost, N-Oxyd-Lost, Äthyleniminobenzochinon vermögen Phosphorglyzerinaldehyddehydrogenase (PGADH) in normalen und myeloischen Leukozyten in hohem Grade zu hemmen, während Endoxan nur eine geringe Wirkung ausübt (26).

Interessant ist auch das Experiment von Schmidt mit Ratten, die Träger von Yoshida-Aszites-Tumor waren. Hier findet sich eine Hypoproteinämie mit starker Erniedrigung des Serumalbumins und entsprechender Erhöhung der α - und β -Globuline. Nach Zufuhr von Endoxan (4 mal 10 mg/kg) bildete sich binnen kurzem der Aszites zurück, während gleichzeitig das Gesamteiweiß wieder anstieg, ebenso die Albumine (29).

Es liegt also unter bestimmten Umständen auch eine unmittelbare Beeinflussung des Eiweißstoffwechsels vor. In neuerer Zeit stellten Holzer und Kröger fest, daß Tetramin-Merck (1-Äthylenimino-2-hydroxy-buten-3) den Einbau radioaktiver Ribose ^{14}C in das DPN hemmt(22).

Auch ein Abfall von ATP durch Einwirkung dieses Zytostatikums auf bei 37^{o} anaerob inkubierte Zellen konnte gezeigt werden, während AMP in hoher Konzentration vorliegt (23).

Unter aeroben Bedingungen untersucht, bleibt ein Absinken des DPN-Spiegels aus (17).

Nach Jühling ist in wachsenden Tumoren Glutaminsäure nicht nachweisbar. Diese stellt aber eine Zentrale im Aufbau und Umbau verschiedenster anderer Aminosäuren und Eiweißverbindungen dar. In Transplantationstumoren konnte man ebenfalls keine Glutaminsäure finden. Sowohl Gaben von E 39 und von TEM bewirken, daß sie in den sich rückbildenden Tumoren wieder auftritt (18). Die Art des Mechanismus läßt sich nicht eindeutig erklären; er wird von Büchner, Freiburg, überhaupt bestritten, während Domagk, gestützt auf die Untersuchungsergebnisse von Warburg über die Bedeutung der aeroben Glykolyse für den Stoffwechsel der Carcinomzelle, die Ergebnisse verteidigt.

N-Oxyd-Lost und Sinalost zeigen eine massive Beeinflussung der Einbaurate von ^{14}C-Lysin in Gewebsproteine. Die Versuche wurden an Homogenaten von Schreier und Zöller durchgeführt.

Colchicin und Democolcin hemmen den Einbau nicht. Triäthylenmelamin (Triamelin) bewirkt eine geringe Verminderung der Einbaurate. Die Chinonderivate, das Zytostatikum G 4073 und Khellin hemmen den Lysineinbau (32).

Vergleichende histologische, zytophotometrische und biochemische Untersuchungen über die Wirkung von Endoxan auf das Jensen-Sarkom der Ratte ließen erkennen, daß der Abfall der DPN-Konzentration sich erst 3 - 4 Tage nach dem Auftreten morphologischer Veränderungen, z.B. einer Ödembildung, an den Tumorzellen zeigt. Holzer betrachtet diesen also nach seinen neuesten Versuchen wahrscheinlich als Sekundäreffekt (7).

Einwirkung von Endoxan auf atypische Plattenepithelzellen führt zu einer Kernmembranschädigung und zum Zelluntergang. Die Manifestation der Zellschädigung während der Mitose tritt in der Interphase nicht deutlich hervor (8).

Elektronenoptische Untersuchungen an Yoshida-Aszites-Tumoren konnten in den Tumorzellen nach zytostatischer Behandlung eine Zunahme der Lipoidgranula und der Ergastoplasmastrukturen feststellen, woran sich meist eine schnelle Karyolyse anschloß (31). Leonardi beobachtete keinen Hemmeffekt von Endoxan auf das Plattenepithelcarcinom des Kehlkopfes im Gegensatz zu anderen N-Lost-Derivaten, z.B. BCM (Mannit-Lost) und Sarkolysin (25). Untersuchungen von Druckrey zeigten, daß Endoxan besonders die plasmatische Zellteilung hemmt, während die mitotische Kernteilung ungestört abläuft. Daraus kann man schließen, daß die zytostatische Wirkung vornehmlich an den Fermenten des Zytoplasmas angreift (4).

In letzter Zeit machte Hohorst darauf aufmerksam, daß durch die Anwendung von Endoxan auch die Glucoseaufnahme in die Zelle geschädigt wird. Eine DPN-Konzentrationsänderung tritt erst später in Erscheinung und ist nicht Ursache der Glykolysehemmung (10).

Schmidt stellte fest, daß Podophyllinotoxinderivate, Äthyleniminverbindungen, N-Lost-Derivate und Carcinophilin auch imstande sind, Hexokinase zu hemmen (30).

METHODISCHES

Es sollte geprüft werden, inwieweit verschiedene Zytostatika die Eigenschaft besitzen, Proteinasen zu hemmen oder zu aktivieren. Die Versuche wurden einerseits an Ovargewebshomogenaten von Schweinen, an Corpus-luteum-Präparaten von Rindern, andererseits an mit Carcinom befallenen menschlichen Eierstöcken durchgeführt.

Jung und Held konnten eine hohe proteolytische Fermentaktivität zwischen pH 1,6 und 7,4 in der Follikelflüssigkeit des Schweineovars nachweisen (19).

Kidess fand die Aktivität von Ovargewebshomogenat am größten in einem Bereich von pH 3,5; das bedeutet im katheptischen Gebiet (20).

Im extrem sauren Bereich sind proteolytische Fermentwirkungen nur bis zu 20 % des Optimums vorhanden, im Trypsinbereich überhaupt nicht.

Die Verarbeitung der Gewebe wurde nach der Methode von Lang und Siebert durchgeführt (24).

Ovarien sind von Bindegewebe befreit worden, die Follikelflüssigkeit wurde abpunktiert, der Rest anschließend gewogen, erst grob, dann fein mit einer verchromten Schere zerkleinert. Dieser Gewebebrei wurde unter ständiger äußerer Kühlung mit Eisstückchen durch einen Glaspistill nach Potter und Elvehjem möglichst kurze Zeit homogenisiert. Zu langsames Arbeiten führt zu einer unerwünschten Erwärmung und damit zur teilweisen Inaktivierung der Fermente.

Aus diesem Grunde sollte auch die Berührung mit Schwermetallen vermieden werden, welche ebenfalls einen Teil der Aktivität zerstören.

Zuvor wurde noch eine 30 % Rohrzuckerlösung hergestellt, die allmählich dem Homogenat zugesetzt wurde. Dieses selbst mußte durch ein Tuch in ein besonderes Gefäß abgepreßt werden, das nunmehr die Fermentstammlösung enthielt.

Zur Erzielung eines günstigen Meßbereiches und möglichst großer linearer Kurvenanteile schloß sich eine Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung in einem dafür notwendigen Verhältnis an. Die Messung der proteolytischen Aktivität erfolgte nach der Methode von Anson.

Die Corpora lutea vom Rind und die menschlichen Ovarialcarcinome wurden einer gleichen Behandlung unterzogen. Als Substrat diente eine 2,5 %-Rinderhämoglobinlösung (Merck).

Mit geeigneten Puffersystemen in einem bestimmten pH-Bereich wurde diese mit einer Verdünnung des Homogenates und Zytostatika in variablen Konzentrationen bei einer Temperatur von 37° C inkubiert.

Die Inkubationszeiten wurden anfangs verändert, in späteren Versuchen erwies sich eine Reaktionsunterbrechung nach 20 und 40 Min. als günstig.

Als Eiweißfällungsmittel wurde eine 10 %-Trichloressigsäure benutzt.

Das klare Filtrat dieses Substanzgemisches wurde mit Phenolreagens nach Folin und Ciocalteu versetzt (5).

Dieses reagiert selektiv mit den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan und erlaubt auf diese Weise, die proteolytische Aktivität verschiedener Fermentextrakte quantitativ zu ermitteln. Es entsteht ein blauer Farbton, dessen Intensität sich mit dem Photometer Elko II von Carl Zeiß messen läßt.

Jedes Reagenzglas enthält:

1 ml Substrat

1 ml Puffer

1 ml Zytostatikum bzw. H_2O

1 ml Fermentlösung

damit erfolgt Inkubation

2 ml TCE (10 %) zur Unterbrechung

Schema der gesamten Versuchsanordnung

	0 Min	20 Min	40 Min
H_2O	0	0	0
Zytost. 10 γ	0	0	0
Zytost. 1 γ	0	0	0
Zytost. 0,1 γ	0	0	0

Nachweis der Eiweißspaltprodukte durch Tyrosinbestimmung

2 ml des klaren Filtrates wurden in 25 ml Meßkölbchen pipettiert, die zuvor mit 5 ml einer 14 % - Sodalösung beschickt worden waren. Hierzu wurde 1 ml eines zuvor 1:3 mit H_2O verdünnten Folinreagenzes gegeben.

Die Kölbchen wurden auf 25 ml mit Wasser aufgefüllt. Die Messung der Extinktion erfolgte in 1 ml Küvetten mit Filter S 72 E 54 gegen einen Leerwert aus Sodalösung und Phenolreagenz.

Aufstellen einer Eichkurve zur Umrechnung auf Tyrosinwerte

1 g L (-)-Tyrosin wurde unter leichtem Erwärmen in 1 l Wasser aufgelöst. Verdünnungen von 40, 60, 80, 120 γ/ml dienten zur Ermittelung entsprechender Extinktionen.

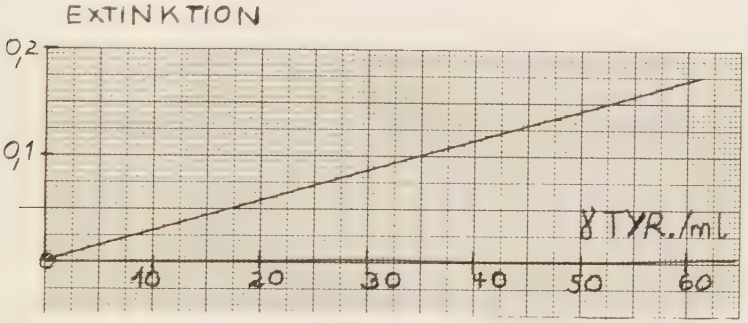


Abb. 1 Eichkurve

Auswertung der Meßergebnisse

Zur Darstellung der Versuchsergebnisse werden im folgenden Tabellen und Kurven benutzt. Die proteolytische Aktivität der einzelnen Fermente wird in γ Tyrosin/mg N angegeben.

Für die Untersuchungen wurden folgende Zytostatika verwandt:

BAYER E 39

MITOMEN "Asta"

HONVAN "Asta"

ENDOXAN "Asta"

THIO-TEPA "Hoechst"

COLCEMID "Ciba"

SARVINAL "Bayer"

Jedes Zytostatikum und der unspezifische Wirkstoff Sarvinal wurden in drei verschiedenen Konzentrationen dem Fermentansatz hinzugefügt:

10 γ / ml
1 γ / ml
0,1 γ / ml

Es sind dies Konzentrationen, in denen die kanzerotoxischen Substanzen auch im Blut vorliegen.
Sie wurden inkubiert mit Fermentsystemen aus:
Ovargewebe von Schwein und Rind,
Corpus-luteum vom Rind,
Ovarialcarcinom vom Menschen.

In den Versuchen wurde der Kathepsinbereich in der Nähe von pH 3,4 besonders geprüft.
Die Zytostatika besitzen auch in vivo eine stärkere Affinität zu einem Zellmilieu im mittelsauren Bereich, ein Umstand, der einen Teil ihrer Tumorselektivität erklären könnte. Denn wegen des gestörten Kohlehydratstoffwechsels entsteht ein erheblicher Überschuß an Milchsäure. Ein Puffergemisch von pH 3,4 wurde aus 1/10 molarer Essigsäure und 1/10 molarem Natriumacetat hergestellt und mit definierten Lösungen an einem Potentiometer geeicht.

Zur Berechnung der γTyrosinwerte / mg N

Die Extinktionswerte sind in Tyrosin umgerechnet worden. Der Extinktionswert nach 0 Minuten, d.h. nach vorheriger Zugabe von TCE, welcher durch schon vorhandene Aminosäuren und andere Phenolkörper zustandekommt, wurde von den übrigen Werten subtrahiert.

Für jede Fermentlösung wurde ein Eigenabbau bestimmt und dieser ebenfalls vom eigentlichen Extinktionswert jeweils abgesetzt.
Die so erhaltenen Tyrosinwerte wurden mit drei multipliziert, da nur 2 ml des Ansatzes zur Bestimmung verwandt wurden. Es wurde dann durch den Stickstoffwert dividiert, um γTyrosin / mg N als Einheit zu erhalten. Die Bestimmung selbst erfolgte nach dem Kjeldahl-Verfahren. +)

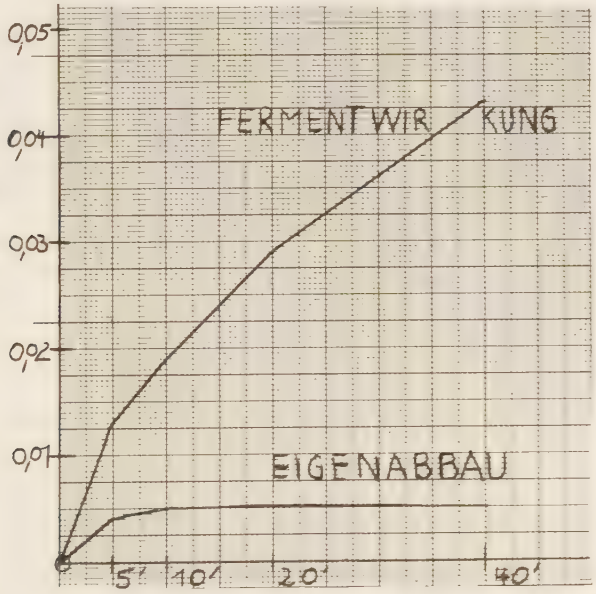


Abb. 2 - Beispiel für den Eigenabbau eines Schweineovarhomogenates 1 : 75 verdünnt, pH 3,4.

+) Für die freundliche Ausführung möchte ich Frl. Wiedemann herzlich danken.

ERGEBNISSE

BAYER E 39 geprüft bei pH 3,4

solubile

2,5 bis-methoxyäthoxy-3,6-bis-äthylen-iminobenzochinon-(1,4)

Schweineovarfermentlösung 1 : 75 verd. (Mittelwerte aus 4 Vers.)

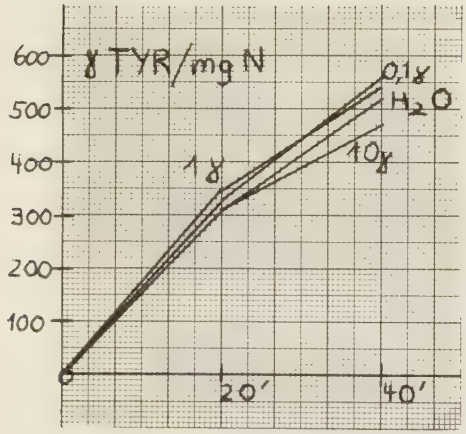


Abb. 3

	20 Min	40 Min
H_2O γ	286	491
10 γ	291	458
1 γ	340	501
0,1 γ	324	524

Rinderovarfermentlösung 1 : 50 verd. (Mittelw. aus 4 Vers.)

	20 Min	40 Min
H_2O γ	156	222
10 γ	153	229
1 γ	151	228
0,1 γ	148	221

Corpus luteum vom Rind 1 : 75 verd. (Mittelwere aus 3 Versuchen)

	20 Min	40 Min
H_2O γ	1583	2353
10 γ	1592	2354
1 γ	1592	2354
0,1 γ	1580	2360

MITOMEN "Asta" geprüft bei pH 3,4

Methyl-bis-(β - chloräthyl)-amin-N-oxyd-hydrochlorid

Schweineovarfermentlösung 1 : 75 verd. (Mittelw. aus 3 Vers.)

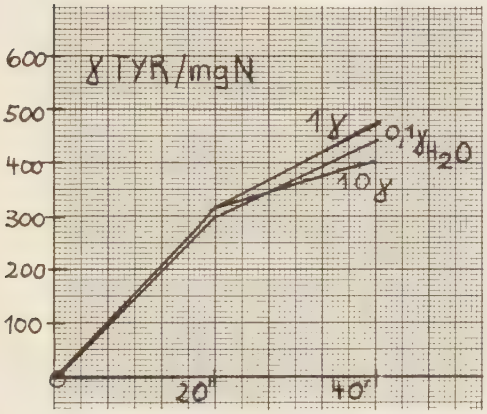


Abb. 4

	20 Min	40 Min
H_2O γ	288	440
10 γ	311	413
1 γ	299	485
0,1 γ	298	434

Rinderovarfermentlösung 1 : 50 verd. (Mittelw. aus 4 Vers.)

	20 Min	40 Min
H_2O γ	154	223
10 γ	150	225
1 γ	148	226
0,1 γ	150	115

Corpus luteum vom Rind
1 : 75 (Mittelwert aus 3 Vers.)

H_2O γ	1586	2365
10 γ	1588	2323
1 γ	1573	2339
0,1 γ	1556	2328

HONVAN "Asta" geprüft bei pH 3,4

Diäthyldioxystilbendiphosphat

Schweineovarfermentlösung 1 : 75 verd. (Mittelw. aus 3 Vers.)

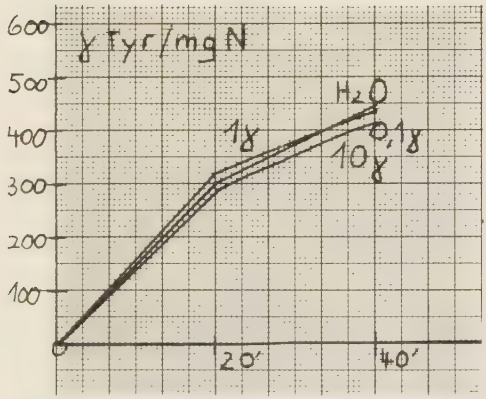


Abb. 5

	20 Min	40 Min
H_2O γ	282	456
10 γ	294	434
1 γ	328	443
0,1 γ	310	443

Rinderovarfermentlösung 1:50 verd. (Mittelw. aus 3 Vers.)

	20 Min	40 Min
H_2O γ	147	230
10 γ	148	228
1 γ	147	225
0,1 γ	147	226

Corpus luteum vom Rind 1 : 75 verd. (Mittelw. aus 4 Vers.)

	20 Min	40 Min
H_2O γ	1580	2343
10 γ	1601	2331
1 γ	1595	2324
0,1 γ	1579	2333

COLCEMID "Ciba" geprüft bei pH 3,4

Desacetyl-N-methyl-colchicin

Schweineovarfermentlösung 1 : 75 verd. (Mittelw. aus 4 Vers.)

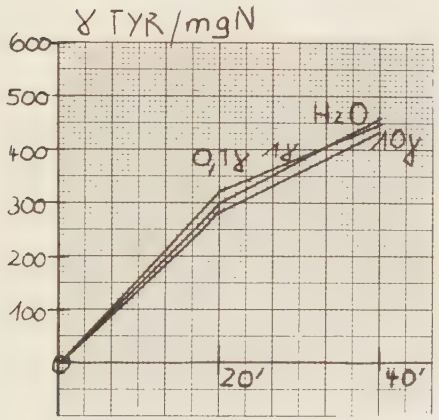


Abb. 6

	20 Min	40 Min
H_2O γ	290	437
10 γ	284	485
1 γ	306	470
0,1 γ	310	471

Rinderovarfermentlösung 1 : 50 verd. (Mittelw. aus 3 Vers).

	20 Min	40 Min
H_2O γ	159	232
10 γ	157	230
1 γ	154	228
0,1 γ	156	230

Corpus luteum vom Rind 1 : 75 verd. (Mittelwert aus 4 Vers.)

	20 Min	40 Min
H^2O γ	1585	2331
10 γ	1592	2353
1 γ	1589	2339
0,1 γ	1595	2345

THIO-TEPA "Hoechst" geprüft bei pH 3,4

Äthylenthiophosphorsäureamid

Schweineovarfermentlösung 1 : 75 verd. (Mittelw. aus 3 Vers.)

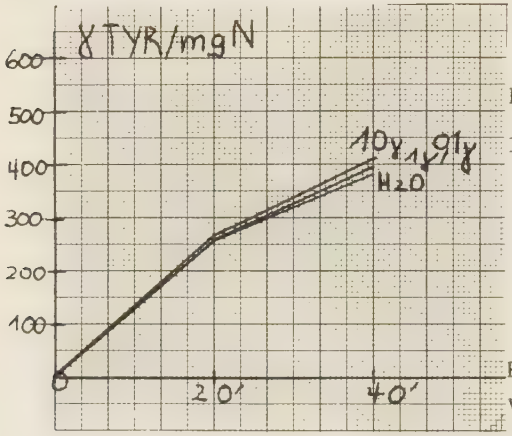


Abb. 7

	20 Min	40 Min
H_2O γ	263	384
10 γ	274	417
1 γ	269	394
0,1 γ	271	393

Rinderovarfermentlösung 1 : 50 verd. (Mittelw. aus 3 Vers.)

	20 Min	40 Min
H_2O γ	155	228
10 γ	152	260
1 γ	157	203
0,1 γ	153	337

Corpus luteum vom Rind 1 : 75 verd. (Mittelw. aus 4 Vers.)

	20 Min	40 Min
H_2O γ	1579	2341
10 γ	1591	2353
1 γ	1589	2348
0,1 γ	1593	2345

ENDOXAN "Asta" geprüft bei pH 3,4

N,N-bis(β-choräthyl)-N'O-propylenphosphorsäure-esterdiamid

Schweineovarfermentlösung 1 : 75 verd. (Mittelw. aus 4 Vers.)

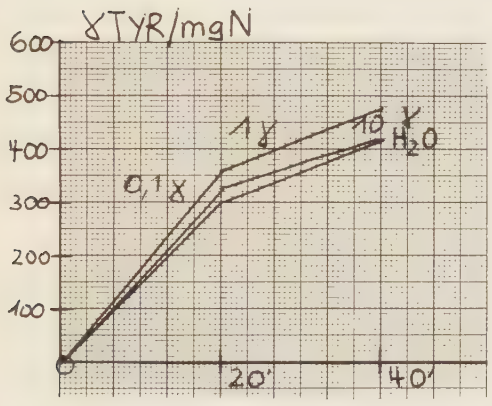


Abb. 8

	20 Min	40 Min
H_2O γ	304	427
10 γ	311	429
1 γ	361	477
0,1 γ	324	424

Rinderovarfermentlösung 1 : 50 verd. (Mittelw. aus 3 Vers.)

	20 Min	40 Min
H_2O γ	155	233
10 γ	155	228
1 γ	148	225
0,1 γ	150	230

Corpus luteum vom Rind 1 : 75 verd. (Mittelw. aus 3 Vers.)

	20 Min	40 Min
H_2O γ	1593	2356
10 γ	1592	2356
1 γ	1586	2342
0,1 γ	1590	2329

SARVINAL "Bayer" geprüft bei pH 3,4

Extrakt aus RES-reichen Organen spezifisch vorbehandelter Tiere, Adjuvans und Roborans zur Tumortherapie

Schweineovarfermentlösung 1 : 75 verd. (Mittelw. aus 4 Vers.)

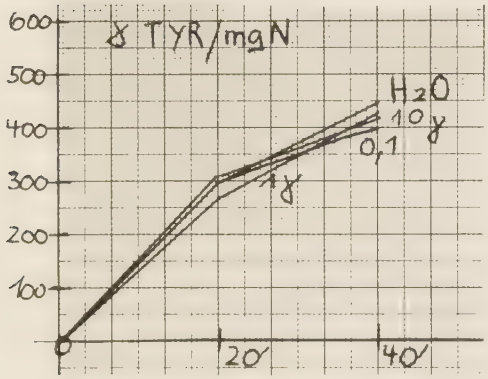


Abb. 9

	20 Min	40 Min
H_2O γ	301	452
10 γ	309	416
1 γ	278	442
0,1 γ	304	406

Rinderovarfermentlösung 1 : 50 verd. (Mittelw. aus 4 Vers.)

	20 Min	40 Min
H_2O γ	150	223
10 γ	154	231
1 γ	150	225
0,1 γ	158	226

Corpus luteum vom Rind 1 : 75 verd. (Mittelw. aus 3 Vers.)

	20 Min	40 Min
H_2O γ	1585	2372
10 γ	1588	2341
1 γ	1591	2351
0,1 γ	1585	2353

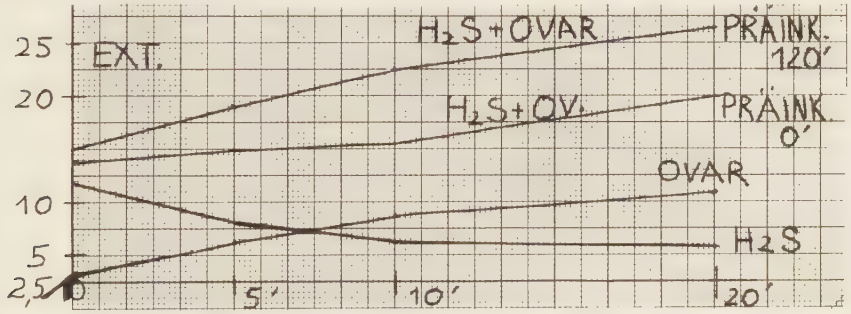
Beschreibung der Versuche

Die Aktivität des Corpus-luteum-Extraktes ist ungefähr 5 mal so hoch wie die der Schweineovarfermentlösung. Die Abweichungen nach Zugabe der Zytostatika in verschiedenen Konzentrationen sind in allen Versuchen durchaus uncharakteristisch und entsprechen der Fehlerbreite der Methode.

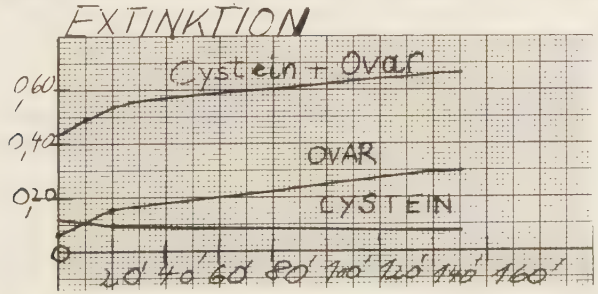
Prüfen auf (andere) Kathepsinaktivatoren

Grassmann und Dyckerhoff fanden, daß SH-Substanzen Kathepsin aktivieren. Zu ihnen gehört z.B. der Schwefelwasserstoff und das Cystein. Fehlt jedoch das Proton in der Verbindung, so hemmen sie Kathepsin und aktivieren dafür wieder andere Fermente. Es wird eine Schwermetallfällung durch SH-Substanzen vermutet und damit Beseitigung einer ursprünglichen Hemmung. Die Originalversuche wurden an der β-Proteinase (Kathepsin) der Niere durchgeführt(6).

Einwirkung einer 0,0075 n H_2S-Lösung auf Kathepsin eines 1 : 12 verdünnten Schweineovarhomogenates nach 0 Min. und 120 Min. Präinkubation bei 37° C. - Abb. 10 -



Einwirkung einer 0,01 n Cysteinlösung auf Kathepsin eines 1 : 12 verdünnten Schweineovarhomogenates. (Es erfolgt hauptsächlich eine Aktivierung autolytischer Prozesse in der Fermentlösung selbst.)



- Abb. 11- Die Molaritäten beziehen sich auf den Ansatz: 1 : 12 verd. Ovarhomogenat plus Aktivator.

Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

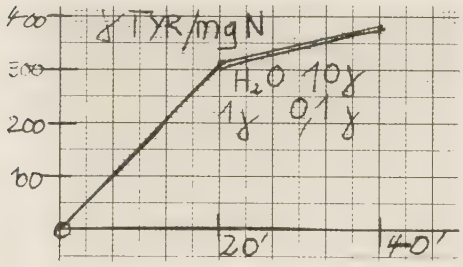
Die Zytostatika Endoxan, Mitomen, Bayer E 39, Honvan, Colcemid, Thio-tepa und der unspezifische Wirkstoff Sarvinal "Bayer" zeigen keine eindeutig nachweisbare Wirkung auf Aktivierung oder Hemmung des Kathepsins in den Homogenaten von Schweineovar, Rinderovar und Corpus luteum vom Rind.

H_2S vermag die proteolytische Fermentaktivität bei Präinkubation von 2 - 3,5 Stunden in gewissem Grade zu steigern. Cystein erhöht die Autolyse.

Liegt eine Aktivierung durch Zytostatika bei veränderten Präinkubationszeiten vor?

Die Zytostatika Endoxan, Bayer E 39 und Mitomen wurden mit 1 : 18 verdünntem Ovarhomogenat bis zu 3 Stunden präinkubiert bei einer Temperatur von 37°C.

Endoxan (Mittelwert aus 2 Versuchen) - Abb. 12 -



	20 Min	40 Min
H_2O γ	329	387
10 γ	326	387
1 γ	329	389
0,1 γ	329	391

Die Zytostatika Honvan und Thio-tepa wurden bis zu 150 Min inkubiert.

Honvan (Mittelwert aus 2 Versuchen)

	10 Min	20 Min	150 Min	
H_2O γ	0,065	0,118	0,266	
10 γ	0,063	0,117	0,266	(Angabe in Extinktionseinheiten)
1 γ	0,068	0,118	0,267	
0,1 γ	0,067	0,117	0,266	

Es konnte weder Hemmung noch Aktivierung der proteolytischen Aktivität festgestellt werden.

Einwirkung von Zytostatika auf Ovarialcarcinom

ENDOXAN

Netzgewebe 1 : 10 verdünnt (Mittelw. aus 3 Ver.)

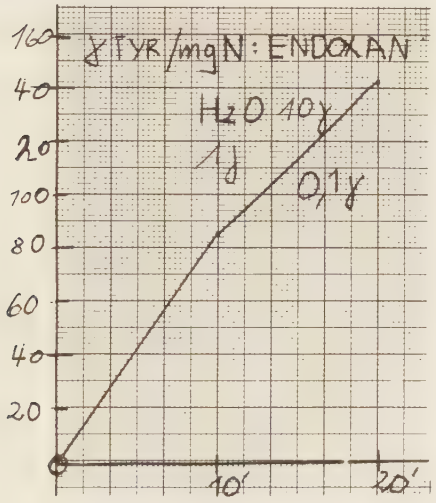


Abb. 13

	10 Min	20 Min
H_2O γ	85	142
10 γ	82	142
1 γ	85	142
0,1 γ	86	142

BAYER E 39

(Mittelwerte aus 3 Vers.)

	10 Min	20 Min
H_2O γ	87	139
10 γ	92	146
1 γ	88	149
0,1 γ	85	142

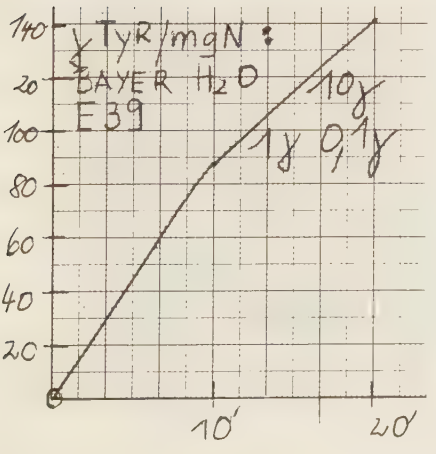


Abb. 14

MITOMEN

(Mittelwert aus 3 Vers.)

	10 Min	20 Min
H_2O γ	84	141
10 γ	88	146
1 γ	92	135
0,1 γ	86	144

Es konnte weder Hemmung noch Aktivierung durch die Einwirkung der Zytostatika festgestellt werden.

Ovargewebe 1 : 10 verdünnt

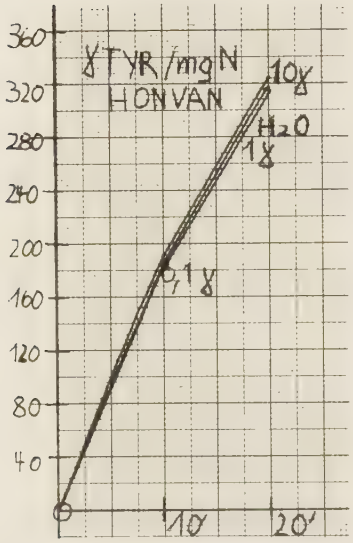


Abb. 15

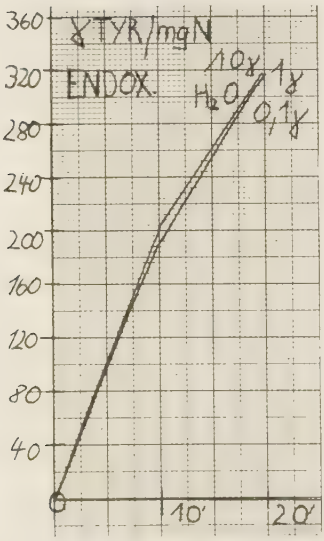


Abb. 16

Es konnte weder Hemmung noch Aktivierung durch die Einwirkung der Zytostatika

HONVAN

(Mittelw. aus 3 Vers)

	10 Min	20 Min
H_2O γ	181	311
10 γ	193	327
1 γ	178	315
0,1 γ	188	317

ENDOXAN

(Mittelw. aus 3 Vers.)

	10 Min	20 Min
H_2O γ	199	320
10 γ	207	318
1 γ	193	317
0,1 γ	187	317

THIO-TEPA

(Mittelw. aus 3 Vers.)

	10 Min	20 Min
H_2O γ	193	324
10 γ	207	328
1 γ	201	328
0,1 γ	208	315

COLCEMID

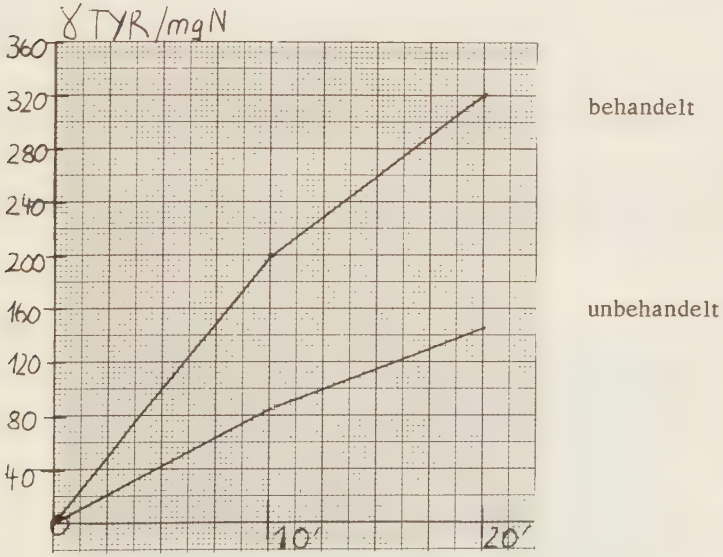
(Mittelw. aus 3 Vers.)

	10 Min	20 Min
H_2O γ	213	325
10 γ	210	314
1 γ	197	297

Vergleich zwischen einem mit Endoxan behandelten und nicht mit Zytostatika behandelten Ovarialcarcinom

Von den beiden untersuchten Ovarialcarcinomen wurde das letztere drei Monate mit Endoxan behandelt. Unter der Therapie bildete sich ein von der Portio bis zum Nabel und nach beiden Seiten in den Mittelbauch ragender, fast unbeweglicher Tumor zurück. Man konnte nur noch hühnereigroße, gut verschiebliche Resistenzen im Bereich beider Adnexen tasten.

Das Operationspräparat, ein teils solides, teils adenomatöses Ovarialcarcinom, zeigte gegenüber einem nicht mit Zytostatika behandelten Tumor außergewöhnlich stärkere proteolytische Aktivität, wenn man die effektive Eiweißspaltung zu den Stickstoffwerten in Relation setzt. Bildet man aus allen errechneten Tyrosinwerten/mg N Mittelwerte, so beträgt die proteolytische Aktivität des unbehandelten Carcinoms nur 42 % des mit Endoxan behandelten Tumors.
Es könnte sich hierbei um eine in vivo-Aktivierung proteolytischer Fermente durch Endoxan handeln



- Abb. 17 - Nach 10 Minuten sind durch das behandelte Carcinom 200 γ Tyrosin/mg N entstanden, durch das unbehandelte 85 γ/mg N.

Einwirkung von Zytostatika auf saure Proteinasen

Geprüft bei pH 1,6 mit HCl - Glycin-Puffer.
Homogenat eines Ovarialcarcinoms. Verdünnung 1 : 5.
Es wurde keine proteolytische Fermentaktivität festgestellt und auch keine Aktivierung durch Zytostatika.

ENDOXAN

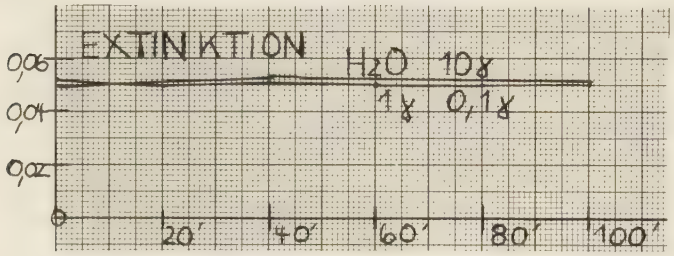


Abb. 18

Einwirkung von Zytostatika auf tryptische Proteinasen

Geprüft bei pH 7,4 mit Kaliumdihydrogenphosphat-dinatrium-hydrogenphosphat-Puffersystem.
Homogenat eines Ovarialcarcinoms. Verdünnung 1 : 5.
Es wurde keine proteolytische Fermentwirksamkeit festgestellt und auch keine Aktivierung durch Zytostatika.

ENDOXAN

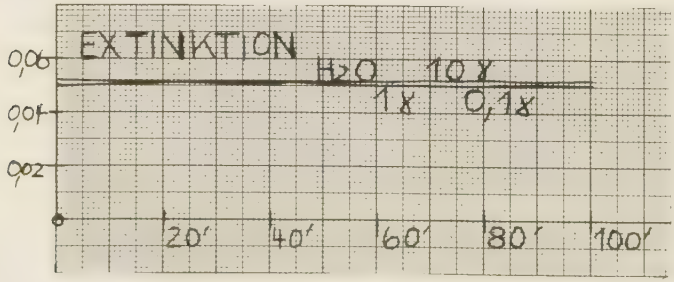


Abb. 19

DISKUSSION

Zytostatika greifen in vielfältiger Weise in den Stoffwechsel der normalen und der Tumorzelle ein. Äthylenimine und Chinone zeigen dabei unterschiedliches Verhalten. Oft wird jedoch auch dieses Einteilungsprinzip durchbrochen. Es besteht Konzentrationsabhängigkeit, und Überschneidungen erschweren die Auswertung der Versuchsergebnisse(27).

Die hauptsächlichen bisherigen Untersuchungen konzentrieren sich auf den Energiestoffwechsel, die Atmung, die aerobe und anaerobe Glykolyse (14). Dabei konnte eine Hemmung der DPN-Synthese, des Einbaues von Ribose in dieses Ferment (22) und eine Blockierung der Triosephosphatdehydrogenase nachgewiesen werden (13).
Auch eine Aktivierung der Ribonukleasen wurde gezeigt (9). Ferner fand man eine Beeinflussung der Einbaurate von Lysin in Gewebsproteine durch bestimmte Zytostatika sowie der Bildung von Glutaminsäure (18).

Es war von Interesse, zu untersuchen, ob auch eine Aktivierung von Proteinasen durch Zytostatika möglich ist. Da Zytostatika ihre physiologische Wirksamkeit im mittelsauren Bereich entfalten (27), wäre eine Aktivierung der Gewebsproteinase Kathepsin denkbar. Eine derartige Beeinflussung muß sogar vorhanden sein, wenn auch auf indirektem Wege; denn soll sich ein Tumor zurückbilden, müssen bestehende Zellstrukturen gelöst, Eiweißverbindungen zerlegt werden.

Sämtliche in vitro-Versuche in verschiedensten Variationen mit tierischen Ovarien und menschlichen carcinomatösen Homogenaten verliefen jedoch negativ. Das schließt aber nicht aus, daß sie an anderen parenchymatösen Organen und Tumoren positiv ausfallen können (1, 2, 16, 25).

Interessant ist die Feststellung einer außergewöhnlich hohen proteolytischen Aktivität eines mit Endoxan behandelten Carcinoms gegenüber einem unbehandelten. Es könnte sich um eine in vivo-Aktivierung durch Endoxan handeln, zumal sich der Tumor unter der spezifischen Therapie erheblich zurückbildete.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Einwirkungen von Zytostatika auf proteolytische Fermente des Ovars studiert. Im Literaturteil wurden die wichtigsten bisherigen Untersuchungen besprochen, die sich mit dem Einfluß cancerotoxischer Substanzen auf den Zellstoffwechsel beschäftigen.

Es folgt die Besprechung der Methoden für die eigenen Experimente, alsdann die Zusammenstellung der damit gefundenen Ergebnisse.

Die in vitro-Versuche konnten eine Aktivierung oder Hemmung eiweißspaltender Fermente nicht konstatieren. Die Abweichungen der Kathepsinaktivität vom Normalkurvenbereich bei Inkubation mit therapeutisch vertretbaren Zytostatikamengen in gewissen Abstufungen sind inkonstant und liegen noch im Fehlerbereich der Methode.

Die außerhalb der physiologischen Wirksamkeit der Zytostatika liegenden Fermente mit Eiweißspaltung im stark sauren und alkalischen Bereich zeigten sich ebenfalls unbeeinflußt.

Ein mit Zytostatika (Endoxan) vorbehandeltes, teils solides, teils adenomatöses Ovarialcarcinom besaß eine viel höhere proteolytische Aktivität als ein gleicher unbehandelter Tumor.
Der unbehandelte Tumor wies nur 42 % der proteolytischen Aktivität des behandelten auf.

Während also die in vitro-Versuche negativ ausfielen, konnte eine in vivo-Aktivierung der Gewebsproteinase Kathepsin durch Endoxan nachgewiesen werden.

LITERATUR

1 Anson, M.L.

"The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin"
J. Gen. Physiol. 22, 79 (1939)

2 Brock, N.

"Neue experimentelle Ergebnisse mit N-Lost-Phosphamid-estern"
Sdbd. Strahlenther. 41/III (1959) 347-54

3 Crabtree, H.G.

"Observations on the carbohydrate metabolism of tumours"
Biochem. J. 23, 536 (1929)

4 Druckrey, H., D.Schmähl

"Krebs-Chemotherapie, Möglichkeit und Grenzen aus experimenteller Sicht"
2. Bielefelder Symposion , 18. April 1959, herausgegeben von
H. Wilmanns, Friedrich-Karl-Schattauer-Verlag Stuttgart

5 Folin Ciocalteu

"On tyrosine and tryptophane determinations in proteins"
J. biol. Chem. 73, 627 (1927)

6 Grassmann, W., H. Dyckerhoff, O. v. Schönebeck

"Über natürliche Aktivatoren und Hemmungskörper proteolytischer Enzyme"
Hoppe-Seylers Z.f. Phys.Ch. 186, 183 ff.

7 Grundmann, E., H. Kröger, H.Holzer

"Vergleichende histologische, zytophotometrische und biochemische Untersuchungen über die Wirkung von Endoxan auf das Jensen-Sarkom der Ratte"
Klin. Wschr. 38 (1960) 546-48

8 Hillemanns, H.G., D. Wagner

"Über Versuche der lokalen zytostatischen Behandlung des sog. Oberflächencarcinoms am collum uteri zur Prüfung der chemotherapeutischen Wirkung auf die atypische Plattenepithelzelle"
Arch. Gyn. 192 (1960) 277-92

9 Hilz, H., E.J. Klempien

"Über die Einwirkung von zytostatischen Verbindungen und Nikotinsäureamid auf Aszitestumor-Ribonuklease (N)"
Biochem. Z. 331, (1959) 563-76

10 Hohorst, H.-J.

"Zum Stoffwechsel der Tumoren"
2. Bielefelder Symposion, 18. April 1959, herausgegeben von H. Wilmanns, Friedrich-Karl-Schattauer-Verlag Stuttgart

11 Holzer, H., J. Haan, D. Pette

"Zusammenhang zwischen Wachstum und Atmung II. Wachstumshemmung des Ehrlich'schen Mäuse-Aszites-Carcinoms mit Jodacetat"
Biochem. Z. 327 (1955) 195-201

12 Holzer, H., E. Holzer, G. Schultz

"Zusammenhang zwischen Wachstum und aerober Gärung"
Biochem. Z. 326 (1955) 385

13 Holzer, H., J. Haan, S. Schneider

"Zum Mechanismus des aeroben Glucose- und Fructoseabbaues im Mäuse-Aszites-Carcinom"
Biochem. Z. 326 (1955) 451

14 Holzer, H., G. Glogner, G. Sedlmayr

"Zum Mechanismus der Glykolysehemmung durch carcino-statisch wirkende Äthylenimine"
Biochem. Z. 330 (1958) 59-72

15 Holzer, H., H. Kröger

"Zum Mechanismus der Wirkung von B 518 (Endoxan-Asta) auf das

Jensen Sarkom und zur Hemmung der Chemotherapie von Tumoren durch das Vitamin Nikotinsäureamid"
Klin. Wschr. 36 (1958) 677-78

16 Holzer, H., H. Kröger

"Zum carzonostatischen Wirkungsmechanismus von Äthylenimin-Verbindungen"
Biochem. Z. 330 (1958) 579-90

17 Holzer, H., Sedlmayr, G.

"Wirkung von E 39 auf den Kohlehydratstoffwechsel von Aszites-tumoren"
Ber. ges. Physiol. (1957) 120

18 Jühling

"Über das Verhalten von freiem l-Glutamin und freier l-Glutamin-säure bei der Chemotherapie experimenteller Tumoren"
Verhandl. d. dtsch. Ges. f. Path. (1957) 365 ff.

19 Jung, G., H. Held

"Über Fermente in der Follikelflüssigkeit"
Arch. f. Gyn. 192 (1959) 146-50

20 Kidess, E.

"Untersuchungen über Fermente im Ovargewebe"
Inauguraldissertation, Tübingen 1960

21 Kröger, H., B. Ullrich, H. Holzer

"Die Wirkung von carcinostatischen Verbindungen auf die Konzentration von Diphosphorpyridinnukleotid in Tumoren"
Arzeneim. Forsch. 9 (1959) 598-600

22 Kröger, H.W., B. Rotthauwe, H. Ullrich, H. Holzer

"Der Einfluß von Carcinotstatika auf den DPN-Stoffwechsel der Tumoren. 1. Einbau von ^{14}C-Ribose und ^{14}C-Nikotinsäureamid in das DPN von Aszites-Zellen"
Biochem. Z. 333 (1960) 155-165, 148-54

23 Kröger, H.W., B. Rotthauwe, H. Ullrich, H. Holzer

"2. Nachweis von DPN-Bausteinen in Aszites-Zellen"
Biochem. Z. 333 (1960) 155-65

24 Lang, K., G. Siebert

Aufbereitung von Gewebe und Zellen in
Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der phys. und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. II, Teil 2, Seite 537 ff.

25 Leonardi, A.

"Untersuchungen zum antitumoralen Wirkungsmechanismus von Endoxan"
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 35 (1959) 14

26 Löhr, G.W.

"Vergleichende Untersuchungen über die Hemmung der Phosphorglycerinaldehyddehydrogenase durch verschiedene zytostatische Substanzen"
Klin. Wschr. 35 (1957) 1163-66

27 Pütter, J.

"Stoffwechselwirkung von Äthyleniminochinonen"
Arzeneim.-Forsch. (Drug Res.) 10 (1960) 8-12

28 Roitt, M.

"The inhibition of carbohydrate metabolism in ascites-tumours-cells"
Biochem. J. 63 (1956) 300

29 Schmidt, C.G.

"Über elektrophoretische Veränderungen von Aszites- und Blutserum tumortragender Tiere nach zytostatischer Behandlung"
Sdbd. Strahlenther. 41/III (1959) 368-76

30 Schmidt, C.G.

"Beeinflussung von Fermenten in menschlichen und experimentellen Tumoren durch Zytostatika"

2. Bielefelder Symposion, 18. April 1959, herausgegeben von H. Wilmanns, Friedrich-Karl-Schattauer-Verlag Stuttgart

31 Schmidt, C.G., H. Themann

"Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Tumorzellen und ihre Beeinflussung durch zytostatische Behandlung"
Zschr. Krebsfrsch. 63 (1960) 351-61

32 Schreier, K., B.V. Wissarianow

"Einfluß von Zytostatika auf den Einbau von Lysin in Gewebsproteine"

Arch. exper. Path. u. Pharmak. 229, 167-70

Lebenslauf

Am 12. März 1939 wurde ich, Gerhard Schettler, in Aue/Sa. geboren.

Von 1945-1953 besuchte ich die Volksschule, von 1953-1957 die Oberschule in Schneeberg/E. Dort bestand ich das Abitur.

Von 1957-1959 studierte ich an der Humboldt-Universität Berlin Medizin und legte das Physikum ab.

1960 studierte ich 1 Semester in Leipzig. Ab Mai 1960 studierte ich Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen.

Im Wintersemester 1961/62 war ich Student an der Universität in Genf. Vom Sommersemester 1962 an studierte ich Medizin an der Universität Hamburg und bestand daselbst das Staatsexamen am 19. Juli 1963.